

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 62-257382

(43)Date of publication of application : 09.11.1987

(51)Int.Cl.

C12N 1/20
// C12P 19/04
(C12N 1/20
C12R 1:46)
(C12P 19/04
C12R 1:46)

(21)Application number : 61-099447

(71)Applicant : YAKULT HONSHA CO LTD

(22)Date of filing : 01.05.1986

(72)Inventor : HOSOYA HIDEO
KIMURA MASAYUKI
ENDO HIROSHI

(54) NOVEL STREPTOCOCCUS ZOOEPIDEMICUS

(57)Abstract:

PURPOSE: To efficiently produce high-molecular weight hyaluronic acid without containing hemolysin, by cultivating a novel microorganism belonging to the genus Streptococcus.

CONSTITUTION: A novel microorganism Streptococcus zooepidemicus YIT2030 (FERM-P No.8746), belonging to the genus Streptococcus, having the ability to produce hyaluronic acid without producing hyaluronidase and capable of exhibiting no hemolysis, is inoculated into a culture medium containing preferably glucose as a carbon source and cultivated at 6W8pH and 25W38°C under aerobic condition to collect the aimed high-molecular weight hyaluronic acid without containing hemolysin at all from the culture fluid.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner s decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner s decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner s decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner s decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-257382

⑤ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和62年(1987)11月9日

C 12 N 1/20
 // C 12 P 19/04
 (C 12 N 1/20
 C 12 R 1:46)
 (C 12 P 19/04
 C 12 R 1:46)

7115-4B
 C-8515-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全8頁)

⑭ 発明の名称 新規なストレプトコッカス・ズーエビデミカス

⑯ 特 願 昭61-99447

⑰ 出 願 昭61(1986)5月1日

⑱ 発 明 者 細 谷 英 雄 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社
内⑱ 発 明 者 木 村 雅 行 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社
内⑱ 発 明 者 遠 藤 寛 東京都港区東新橋1丁目1番19号 株式会社ヤクルト本社
内

⑲ 出 願 人 株式会社ヤクルト本社 東京都港区東新橋1丁目1番19号

明 細 書

1. 発明の名称

新規なストレプトコッカス・ズーエビデミカス

2. 特許請求の範囲

(1) ヒアルロン酸生産能を有し、ヒアルロニダーゼ非生産性でかつ非溶血性を示すストレプトコッカス・ズーエビデミカス (*Streptococcus zooepidemicus*)。

(2) 下記の菌学的性質を示す特許請求の範囲第1項に記載のストレプトコッカス・ズーエビデミカス

- (a) グラム染色性：陽性
- (b) 10℃増殖性：陰性
- (c) 45℃増殖性：陰性
- (d) 0.1%メチレンブルー抵抗性：陰性
- (e) 6.5%食塩抵抗性：陰性
- (f) 40%胆汁抵抗性：陰性
- (g) バシトラシン抵抗性：陽性
- (h) pH 9.6抵抗性：陰性
- (i) 60℃、30分抵抗性：陰性

(j) ゼラチン分解性：陰性

(k) 澱粉分解性：陽性

(l) 馬尿酸ソーダ分解性：陰性

(m) エスクリン分解性：弱陽性

(n) アルギニン分解性：陽性

(o) 糖醗酵性：グルコース、ガラクトース、シ
 ュークロース、ラクトース、マルトース、
 ソルビトールおよびサリシンは陽性、
 グリセリン、マンニトール、トレハロー
 スおよびアラビノースは陰性。

(3) ストレプトコッカス・ズーエビデミカスがス
 トレプトコッカス・ズーエビデミカス YIT
 2030 (微工研菌寄第8746号) である特
 許請求の範囲第1項または第2項に記載のスト
 レプトコッカス・ズーエビデミカス。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明はヒアルロン酸生産能を有し、ヒアル
 ロニダーゼ非生産性でかつ非溶血性を示す新規
 なストレプトコッカス・ズーエビデミカス

(*Streptococcus zooepidemicus*)に関する。より具体的には、本発明は溶血素を含まずかつ高分子量のヒアルロン酸を効率よく生産する能力を有するストレプトコッカス・ゾーエピデミカスの変異株に関する。

従来の技術

ヒアルロン酸は今日では動物体の結合組織のあらゆる部分に存在することが認められており、工業的には鶏のトサカや膀胱等の生体組織から抽出法によって得られ、その機能は細胞間に水を保持し、又組織内にゼリー様マトリックスを形成して細胞を保持したり、細胞間の物質移動を制御したり、外からの物理的ショックあるいは細菌等の感染を防ぐことが挙げられている。このような機能を利用してヒアルロン酸は医薬品（関節炎治療薬、眼薬、創傷治療剤等）、化粧品等に使用されている。

しかしながら生体組織からの抽出によるヒアルロン酸の製造は、分離精製の複雑性のため大量生産がむづかしく極めて高価である。そして

このことがヒアルロン酸の用途開発の道を閉ざしている。

微生物によるヒアルロン酸の生産についてはストレプトコッカス属細菌のうちの、ランズフィールド（Lancefield）血清群のA、CおよびD型菌、例えばストレプトコッカス・ピオゲネス（*Streptococcus pyogenes*）、ストレプトコッカス・ゾーエピデミカス（*Streptococcus zooepidemicus*）、ストレプトコッカス・エクイ（*Streptococcus equi*）、ストレプトコッカス・エクイシミリス（*Streptococcus equisimilis*）、ストレプトコッカス・ディスガラクチエ（*Streptococcus dysgalactiae*）およびストレプトコッカス・フェカリス・バー・ザイモゲネス（*Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*）そしてパスツレラ・マルトシダ（*Pasteurella multocida*）等がヒアルロン酸を生成することが既に知られており、例えばケンダー等（P.E. Kendall et al., J.Biol.Chem., 118, 61, 1937）、ピアース等（W.A. Pierce et al., J.Bact., 63,

3

301, 1952）、マックレンナン（A.P. MacLennan, J.Gen.Microbiol., 14, 134-142, 1956; J.Gen.Microbiol., 15, 485-491, 1956）、ホルムストローム等（B. Holmström et al., Appl.Microbiol., 15, 1409-1413, 1967）、ウールコック（J.B. Woolcock, J.Gen.Microbiol., 85, 372-375, 1974）、キエム等（B. Kjems et al., Acta Path.Microbiol.Scand.Sect.B, 84, 162-164, 1976）、バーガン等（T. Bergan et al., Acta Path.Microbiol.Scand., 75, 97-103, 1969）そしてシフォネリ（J.A. Cifonelli, Carbohydr.Res., 14, 272-276, 1970）によって既に報告されている。これらの報告はヒアルロン酸の大量生産を目的としたものではなく、炭素源としてグルコースを1-1.5%用いて培養したもので、そのヒアルロン酸生産量は0.5-0.6 g/l以下であり、対糖収率は6%以下であった。マックレンナンは上記の報告の中でストレプトコッカス属のランズフィールド血清群C型菌の一種について好気条件による培養はヒアルロン酸の生産を促進する可能性があることを報告して

4

いる。上記のヒアルロン酸を生産する微生物のうち、ストレプトコッカス属のランズフィールド血清群A型菌やパスツレラは人に対する病原菌として知られ、実際大量培養するには不適である。

工業的にストレプトコッカス属のヒアルロン酸生産菌を培養して、その培養液からヒアルロン酸を抽出し、精製する方法が特開昭58-56692号に開示されている。この方法はストレプトコッカス属のランズフィールド血清群A、C型菌を培養してヒアルロン酸を大量に得る方法で、炭素源としてグルコースを培地に8%添加して培養し、4 g/lのヒアルロン酸を得ている。この場合のヒアルロン酸の対糖収率は5%であり、グルコース添加量を1%から8%と変化させても変わっていない。したがってこの対糖収率（5%）は既報告におけるヒアルロン酸生産菌の対糖収率とほとんどかわりはない。この他にストレプトコッカス属細菌を使用してヒアルロン酸を得る方法として、特開昭60-5

00597、特開昭60-133894、特開昭61-15698が有るが、得られるヒアルロン酸が低分子量であったり、収率が低いなどの問題点が存在する。又いずれも、ヒアルロン酸生産菌株がストレプトリジン（可溶性溶血素）を生成し、 β -溶血性を示す事が知られている。このような菌を大量に培養してヒアルロン酸を生産しようとする場合、該溶血素がヒアルロン酸生産物へ混入するおそれがあり、かかるヒアルロン酸を化粧品や医薬品に配合することは好ましくない。

この欠点を改良する為に、化学変異剤による変異処理によって、ストレプトリジン生成能を欠如させたヒアルロン酸生産菌株を培養することによってヒアルロン酸を得る方法が特開昭60-251898に開示されている。この中には、グルコースを6%添加することにより3.6g/lのヒアルロン酸が得られたことが記載されており、この時のヒアルロン酸の対糖収率は6%であり、やはり対糖収率の観点からは生産性

の低いものである。

発明が解決しようとする問題点

上記問題点に鑑み、溶血素（ストレプトリジン）を生成せず、高いヒアルロン酸生産能を有する微生物を創製することを目的として鋭意研究の結果、自然界から単離したヒアルロン酸生産能を有するストレプトコッカス・ズーエビデミカスから変異処理によって得た溶血性をしめさなくなった菌株を、再度変異処理することにより、ヒアルロニダーゼ生成能を欠如し、高分子量ヒアルロン酸の生産能が極めて高い新規な菌株を得ることに成功した。

本発明はかかる知見に基づいて完成されたものであり、したがって本発明は溶血素を含まずかつ高分子量のヒアルロン酸を効率良く生産する能力を有するストレプトコッカス・ズーエビデミカスの変異株を提供するものである。

問題点を解決するための手段

(1) 変異株の取得

本発明者らは、本発明の目的を達成するべく、

次の方法により新規変異株を取得した。まず牛鼻粘膜よりヒアルロニダーゼ（ヒアルロン酸分解酵素）の強い生成能を有しかつヒアルロン酸を生産するランスフィールド血清群C型に属するストレプトコッカス・ズーエビデミカス（本菌の同定は、バージェイズ・マニュアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー第8版、1974によった）を得た。この菌株はマックレナン（MacLennan, J. Gen. Microbiol., 14, 134-142, 1956）が指摘したように好気条件においてヒアルロン酸を良く生産し、炭素源としてグルコースを用いた場合、4%のグルコース添加によって2g/lのヒアルロン酸を生産した（ヒアルロン酸の対糖収率は5%）。そしてこの時得られたヒアルロン酸の分子量は30-60万であった。この菌株を常法（細菌・フェージ遺伝実験法、蛋白質核酸酵素別冊、共立出版1972）によって紫外線や化学剤（N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン（NTG）、エチルメタンスルホン酸等）で処

理して、この処理菌体を血液寒天培地に混釈してまき、溶血性を示さない集落を採取し、次にこの菌株を再び変異処理した後、ヒアルロン酸を含有した栄養寒天培地上に塗布し、ヒアルロン酸を分解しない集落を採取することによってストレプトコッカス・ズーエビデミカスの変異株1株を得た（後記実施例1参照）。

(2) 菌学的性質

後記実施例1で得たストレプトコッカス・ズーエビデミカスの変異株（以下本菌という）は、トッド・ヒュイット・ブロス（Todd Hewitt broth）寒天培地上で極めて強い粘性を有する透明な集落を形成し、非溶血性（ β -溶血性：陰性）、ヒアルロニダーゼ非生産性、ランスフィールド血清群C型に属する連鎖状球菌であり、本菌の菌学的性質は下記の通りである。

- (a) グラム染色性：陽性
- (b) 10℃増殖性：陰性
- (c) 45℃増殖性：陰性
- (d) 0.1%メチレンブルー抵抗性：陰性

- (e) 6.5%食塩抵抗性：陰性
 (f) 40%胆汁抵抗性：陰性
 (g) バシトラシン抵抗性：陽性
 (h) pH 9.6抵抗性：陰性
 (i) 60℃、30分抵抗性：陰性
 (j) ゼラチン分解性：陰性
 (k) 澱粉分解性：陽性
 (l) 馬尿酸ソーダ分解性：陰性
 (m) エスクリン分解性：弱陽性
 (n) アルギニン分解性：陽性
 (o) 糖醗酵性：グルコース、ガラクトース、シュクロース、ラクトース、マルトース、ソルビトールおよびサリシンは陽性、グリセリン、マンニトール、トレハロースおよびアラビノースは陰性。

本発明者らは本菌の菌学的性質から、本菌をストレプトコッカス・ズーエビデミカス YIT 2030 と命名し、工業技術院微生物工業技術研究所に微工研菌寄第 8746 号として寄託されている。

1 1

ある。更に培養時、本菌が乳酸を生成しその乳酸によって菌の増殖ならびにヒアルロン酸の生産が抑制されることから、乳酸の中和の為にアルカリ水溶液を添加して、pH 6-8 の範囲内に調整することが必要である。この時使用するアルカリ水溶液は水酸化ナトリウム、水酸化カリウムの水溶液やアンモニア水でよい。

本菌は高分子量のヒアルロン酸（分子量200-300万）を極めて高い収率、生産率で生産する菌株であるが、炭素源としてグルコースを用いると特に良い結果がえられる。糖の添加量3%以下では対糖収率14-15%であり、それ以上の添加量では若干対糖収率は減少する傾向にあった。糖の添加を6%にすると（参考例1参照）、培養液の粘性は36℃で8000センチポアズ（cP）となり、ほとんど培養液は流動性がなくなり攪拌速度を上げても影響なく培養の限界となった。

第1表に培地中のグルコースの添加量を変えて培養したときのヒアルロン酸生産量を示した。

(3) 本菌によるヒアルロン酸の製造

本菌を培養してヒアルロン酸を得る培地は、炭素源、有機無機窒素源、無機塩およびその他必要に応じて有機微量栄養素を含有するものであることが好ましい。炭素源としては、グルコース、ガラクトース、シュクロース、ラクトース、フラクトース、マルトース、ソルビトール、澱粉加水分解物等の糖分を含むものが好ましく、他には有機酸や脂肪族アルコール等でもよい。窒素源としては有機無機一般的な材料でよく、各種肉エキス、アミノ酸混合物、ペプトン、酵母エキス等が好ましい。更に、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、鉄等の塩化物、硫酸塩、磷酸塩、硝酸塩、炭酸塩そしてビタミンなどが必要に応じて添加される。

培養は好氣的条件が必須であり、培養液の粘度の上昇に応じ攪拌速度を上げるのが良いが過度の攪拌は好ましくない。培養温度は菌の増殖が行われる25-38℃で行うことが一般的で

1 2

即ち生成ヒアルロン酸を常法により精製した結果、グルコース1%添加時には対糖収率15%で1.5g/ℓ、6%添加時には対糖収率11%で6.7g/ℓのヒアルロン酸が得られた。

第1表

グルコース 添加量(%)	0.5	1	3	4	6
ヒアルロン酸 生産量 (g/ℓ)	0.7	1.5	4.2	5.1	6.7
対糖収率(%)	14	15	14	12.8	11.1
最終培養液 粘度(cP)	14	67	1200	5000	8000
培養時間(hr)	10	13	20	23	39

(注) pH 7、温度37℃ 通気攪拌培養

次いでグルコース2%の組成の培地を使用し、希釈率0.3 (hr⁻¹) で連続培養を行うと、操作し易い低粘度で極めて安定に連続的に高収率、高生産率でヒアルロン酸を生産することができた。ヒアルロン酸の対糖収率は15%、その生

産性は 0.9 g/l/hr であり、一日当たり 21.6 g/l のヒアルロン酸を生産することができた（参考例2参照）。

本菌は高分子物質として、ヒアルロン酸以外の物質は培養液中に蓄積しないので、培養後、培養液中に蓄積されたヒアルロン酸の分離、精製は容易で、既に公知の多糖類の分離精製法を用いればよい。

ヒアルロン酸の分離、精製法の一例を示す。培養液を適当な粘度となるように（ 100 センチポアズ以下が好ましい）水で希釈し、トリクロル酢酸にて pH を 4 以下にする。次いで遠心分離あるいは膜濾過（ポアサイズ $0.2 \mu\text{m}$ 以下）によって菌体を分離除去する。次に溶液中に溶解している低分子物質を、限外濾過、透析、有機溶媒沈澱法又はイオン交換樹脂等による吸着法などによって除去した後、有機溶媒沈澱法、凍結乾燥又は噴霧乾燥などの手段を用いてヒアルロン酸を得ることができる（参考例1参照）。

15

(7) 分子量は粘度測定法 (T.C. Laurent et al., Biochim. Biophys. Acta, 42, 476-485, 1960)

による結果、 $200 - 300$ 万であった。

以下に実施例および参考例を示して本発明をさらに詳細に説明する。

(実施例1)

牛鼻粘膜より採取した、 β -溶血性を示し、ヒアルロニダーゼを生産し、かつヒアルロン酸を生産するストレプトコッカス・ゾーエビデミカスをトッド・ヒューイット・ブロス培地（ディフコ製）中、 37°C で 10 時間培養し、対数増殖期の菌体を遠心分離によって集め、低温下遠心分離を繰り返しつつ 2 回 0.05 M トリス-マレイン酸緩衝液 ($\text{pH} 6.0$) を用いて無菌的に洗浄した後、 1×10^8 /ml の菌濃度となるように同緩衝液に懸濁し、これに NTG を $200 \mu\text{g/ml}$ のなるよう添加し 37°C にて 30 分間振とうした。つづいて、低温下菌体を 0.05 M トリス-マレイン酸緩衝液 ($\text{pH} 6.0$) で 2 回洗浄した後、トッド・ヒューイット・ブロス培地に接種

17

このようにして上記培養液から抽出精製して得たヒアルロン酸について、ヒアルロン酸標品 (Sigma社製) と対比しながら種々の検討を行った結果、本品はヒアルロン酸であることを確認した。以下にその性質を示す。

- (1) 酢酸セルロース膜を用いる電気泳動において標品と同じ移動度を示す。
- (2) 放線菌ヒアルロニダーゼ（天野製薬製）によって分解を受け、その分解物をシリカゲル薄層クロマトグラフィーにかけると、処理後の標品分解物と同じ移動度で二つのスポットが現れる。
- (3) 化学組成を分析すると、 N -アセチル-D-グルコサミンとD-グルクロン酸がモル比 $1:1$ で存在する。
- (4) 比旋光度は ($\alpha_D^{20} = -69^\circ$ である。
- (5) 薄膜法による赤外吸収スペクトルは第3図の通りで標品と同じ。
- (6) 重水に溶解して測定した ^{13}C -NMR スペクトルは第4図の通りで標品と同じ。

16

して 37°C 、 18 時間培養した。この培養液を滅菌生理食塩水にて 1×10^3 /ml となるよう希釈し、その 0.1 ml を血液（ウサギ脱繊維血）寒天 (20 ml) に混釈してまき培養し、溶血性を示さない集落を採取した。この変異株の取得頻度は約 4×10^{-6} であった。次にこの非溶血性菌株を、上と同様に、トッド・ヒューイット・ブロス培地に 37°C で培養し、対数増殖期の菌体を集め、 0.05 M トリス-マレイン酸緩衝液 ($\text{pH} 6.0$) で洗浄後、 NTG $200 \mu\text{g/ml}$ を含む同緩衝液中で 37°C 、 20 分間振とうした。つづいて、低温下菌体を同緩衝液で洗浄後、限外濾過処理培地（トッド・ヒューイット・ブロス培地からアミコン製限外濾過膜 $\text{YM}-10$ にて高分子画分を除去したもの）に接種して 37°C 、 18 時間培養した。この培養液を滅菌生理食塩水にて $1 - 5 \times 10^2$ /ml となるよう希釈し、その 0.1 ml をヒアルロン酸ソーダ 0.1% を含む上記限外濾過処理培地寒天（高純度寒天）上に塗布して 37°C 、 $20 - 40$ 時間モイスト

18

チャーチャンバー中で培養し、増殖した集落中の菌をレプリカ法にて採取しておき、寒天上に10%セチルピリジニウムクロライド水溶液を噴霧して、約50万の菌株の中から集落周囲が濁る集落を形成するヒアルロニダーゼ非生産変異株ストレプトコッカス・ズーエビデミカスYIT2030を取得した。

なお上記ヒアルロニダーゼ生産・非生産菌の識別法はエリカバルケ等の方法(Erika Balke et al., Zbl. Bakt. Hyg. A, 259, 194-200, 1985)を改変して行った。

(参考例1) バッチ培養

グルコース6%、ポリペプトン(大五栄養化学製)1.5%、パン酵母エキス(オリエンタル酵母工業製)0.5%、磷酸第二カリ0.2%、硫酸マグネシウム7水塩0.1%、塩化カルシウム0.005%、アデカノールLC-109(消泡剤 旭電化工業製)0.001%の組成の培地(pH7.0)を10ℓのジャーフェーマンターに5ℓ入れ、滅菌後、前培養したストレプトコッカ

ス・ズーエビデミカスYIT2030を1%接種し、6N-水酸化ナトリウム水溶液にて培養pHを7に連続的に調節しながら37℃で39時間通気攪拌培養した。

グルコースは別滅菌して、培養開始時に一度に添加した。この時の培養経過を第1図に示す。培養の経過と共に、ヒアルロン酸が蓄積し培養29時間で、培養液の粘性は8000センチポアズ近くに達しほとんど流動性がなくなり、培養39時間後、培養液中のグルコースが零に達した時点で培養を終了した。

収穫した培養液は流動性がないため、これを水にて粘性が100センチポアズ以下となるように希釈した。次ぎにこの溶液をトリクロル酢酸にてpHを4以下にして、中空糸マイクロフィルターモジュール(PH-103 旭化成製)に通し、菌体および不溶成分を除去し、更に中空糸限外濾過膜(HIP30-43 アミコン製)に、濾過内液に水を注加しながら通し溶液中の低分子物質を除去した。そしてこの溶液を凍結乾燥法によって

19

乾燥しヒアルロン酸を培養液1ℓ当たり6.7g得た。

(参考例2) 連続培養

グルコース濃度を2.5%にした以外は参考例1と同一の組成の培地を10ℓのジャーフェーマンターに5ℓ入れ、滅菌後(グルコースは別滅菌)、前培養したストレプトコッカス・ズーエビデミカスYIT2030を1%接種し、6N-水酸化ナトリウム水溶液にて培養pHを7に調節しながら、37℃で15時間通気攪拌培養した。その後グルコース濃度を2%にした以外は参考例1と同一の組成の培地を、希釈率0.3(hr⁻¹)で連続的に注加しながら、37℃、pH7で通気攪拌連続培養を一週間おこなった。

この時の培養経過を第2図に示す。培養槽外に流出した培養液を一定時間ごとに集め、参考例1と同様にしてヒアルロン酸を抽出精製した。この結果、ヒアルロン酸の対糖収率は15%、その生産性は0.9g/ℓ/hrであり一日当たり21.6g/ℓのヒアルロン酸を得ることができた。

20

発明の効果

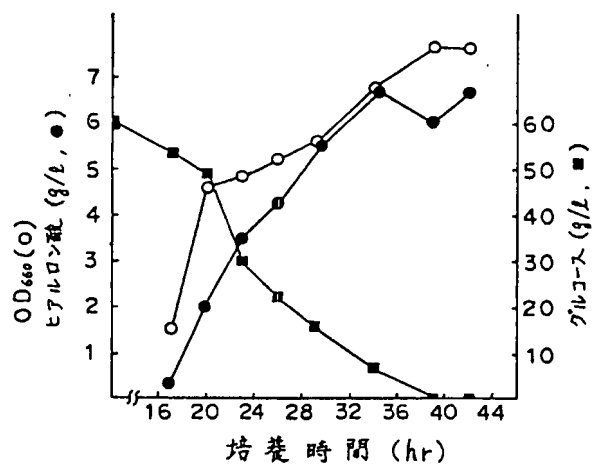
本発明によるストレプトコッカス・ズーエビデミカス変異株を培養することによって、今まで報告されたストレプトコッカス属細菌を使ったヒアルロン酸の製造法における収率、収量をはるかに上回る、ストレプトリジンの混入の全く無いかつ高分子量のヒアルロン酸を高収率、高生産率で安価に得ることができる。この様にして製造したヒアルロン酸は化粧品、医薬品原料として最適なものである。

4. 図面の簡単な説明

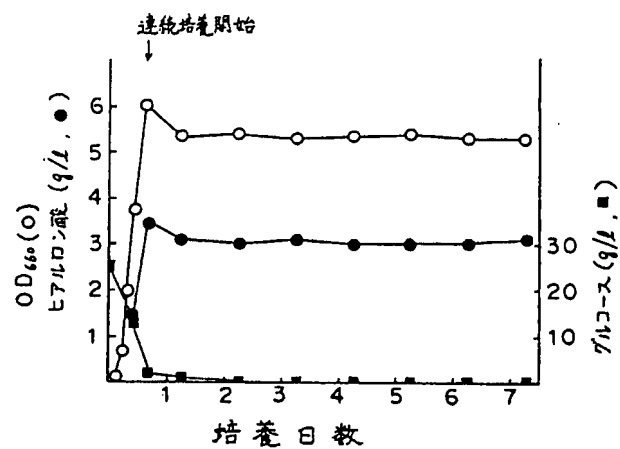
第1図は本発明の参考例1におけるヒアルロン酸製造の培養経過を示す図であり、第2図は参考例2における培養経過を示す図であり、第3図および第4図はそれぞれ参考例1で得られたヒアルロン酸の赤外吸収スペクトルおよびNMRスペクトルを示す図である。

特許出願人 株式会社ヤクルト本社

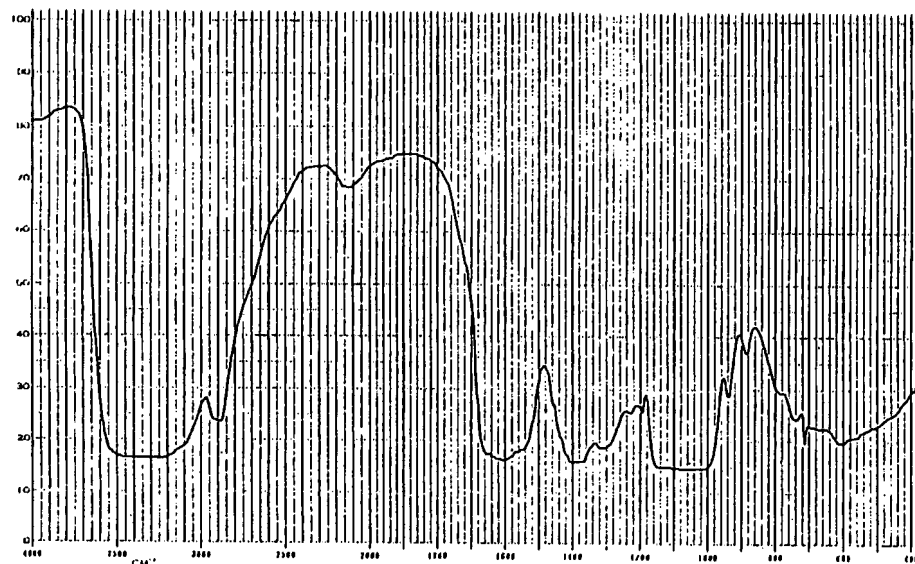
第 1 図



第 2 図



第 3 図



第 4 図

